



# Diagnostický klíčící test pro stanovení celkové kontaminace zrna obilovin fusariovými mykotoxiny

**Kateřina Pazderů  
Zdenka Vepříková  
a kolektiv**

**Certifikovaná metodika**

*Metodika byla vytvořena jako výstup  
v rámci projektu NAZV QI111B154  
„Bezpečnost cereálních bioproduktů  
z pohledu výskytu alternáriových  
a fusariových mykotoxinů“.*

**Česká zemědělská univerzita v Praze,  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,  
Fakulta potravinářské a biochemické technologie**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta**

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha**

## **Diagnostický klíčící test pro stanovení celkové kontaminace zrna obilovin fusariovými mykotoxiny**

### **Certifikovaná metodika**

Ing. Kateřina Pazderů, Ph.D.

Ing. Zdenka Vepříková

Ing. Marta Václavíková, Ph.D.

prof. Ing. Ivana Capouchová, CSc.

prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

doc. Ing. Petr Konvalina, Ph.D.

doc. Ing. Evženie Prokinová, CSc.

Ing. Dagmar Janovská, Ph.D.

Ing. Hana Honsová, Ph.D.

**Praha**

**2013**

Poděkování: Certifikovaná metodika je dílčím výstupem projektu NAZV QI111B154 „**Bezpečnost cereálních bioproduktů z pohledu výskytu alternáriových a fusariových mykotoxinů**“.

Kolektiv autorů:      Ing. Kateřina Pazderů, Ph.D., ČZU, (22 %), pazderu@af.czu.cz  
                                 Ing. Zdenka Vepříková, VŠCHT, (22 %), Zdenka.Veprikova@vscht.cz  
                                 Ing. Marta Václavíková, Ph.D., VŠCHT, (14 %)  
                                 prof.Ing. Ivana Capouchová,CSc., ČZU, (10 %)  
                                 prof.Ing. Jana Hajšlová,CSc., VŠCHT, (10 %)  
                                 doc.Ing. Petr Konvalina, Ph.D., JU, (7 %)  
                                 doc.Ing. Evženie Prokinová, CSc., ČZU, (5 %)  
                                 Ing. Dagmar Janovská, Ph.D., VÚRV, (5 %)  
                                 Ing. Hana Honsová, Ph.D., ČZU, (5 %)

Oponenti:                Ing. Tibor Sedláček (Výzkumné centrum SELTON, s.r.o.)  
                                 Ing. Martin Leibl, Ph.D. (MZe ČR)

Uplatněná certifikovaná metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR – Odborem environmentálním a ekologického zemědělství pod č. 3/2013-17252.

**ISBN 978-80-213-2427-5**

## **Diagnostický klíčící test pro stanovení celkové kontaminace zrna obilovin fusariovými mykotoxiny**

**Abstrakt:** Předložená metodika slouží k objektivnímu posouzení celkové mykotoxinové kontaminace obilovin pro potravinářské využití. Vlastní klíčící test spočívá v přípravě vzorků a uvolnění vázaných forem mykotoxinů v zrně. Druhou částí je stanovení DON, D3G, 3-/15-ADON v připraveném vzorku naklíčeného zrna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí (U-HPLC-HRMS). Obě části metodiky tvoří jeden celek, lze je ale využít i samostatně pro stanovení ve dvou následných krocích v různých laboratořích.

**Klíčová slova:** mykotoxiny, klíčení, DON, D3G, LC-MS

## **Diagnostic germination test for evaluation of total fusarium mycotoxins in cereal grains**

**Abstract:** The aim of presented methodology is an objective evaluation of total mycotoxin contamination of cereals intended for further food processing utilization. The intrinsic germination test consists firstly of samples preparation part, within which conjugated mycotoxins are released from the matrix of grains. The second part is represented by the analytical determination of DON, D3G and 3-/15-ADON in prepared samples of germinated grains using the U-HPLC-HRMS method. Both of these parts represent the entire methodology, but it is possible to use them separately and subsequently in two different laboratories.

**Keywords:** mycotoxins, germination, DON, D3G, LC-MS

Pazderů, K., Vepříková, Z., Václavíková, M., Capouchová, I., Hajšlová, J., Konvalina, P., Prokinová, E., Janovská, D., Honsová, H. (2013). Diagnostický klíčící test pro stanovení celkové kontaminace zrna obilovin fusariovými mykotoxiny. ČZU v Praze, 28 s., ISBN 978-80-213-2427-5

## Obsah

I. Cíl metodiky .....	5
II. Popis metodiky .....	6
1. Úvod .....	6
2. Vlastní metodika .....	11
2.1 Klíčící test .....	11
2.2 Stanovení mykotoxinů .....	12
2.3 Seznam použitých zkratk a symbolů .....	21
2.4 Základní informace o projektu .....	22
III. Srovnání novosti postupů .....	23
IV. Popis uplatnění metodiky .....	24
V. Ekonomické aspekty .....	25
VI. Seznam použité související literatury .....	26
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice .....	28

## **I. Cíl metodiky**

Metodika je určena pro laboratoře obchodních a zpracovatelských organizací, zabývajících se kvalitou a jakostním hodnocením cereálních potravinářských a krmných surovin. Dále je využitelná i pro laboratoře šlechtitelských firem, v rámci komplexního hodnocení genotypů a šlechtitelských materiálů obilnin. Předpokládá se také využití metodiky při studiu potravinářských, případně i zemědělsky orientovaných oborů.

Cílem metodiky je nabídnout výše uvedeným organizacím a institucím pracovní postup stanovení celkové úrovně fusariových mykotoxinů v zrně obilovin (zejména pšenice a ječmene, příp. žito), včetně potenciálně přítomných maskovaných forem mykotoxinů, které představují riziko zvýšené kontaminace mykotoxiny zejména pro spotřebitele konečných produktů. Sledování změn poměru volných a vázaných forem mykotoxinů, zjišťovaných v průběhu klíčícího testu, by současně mohlo napomoci charakterizovat úroveň rezistence genotypů obilnin vůči fusariu.

## II. Popis metodiky

### 1. Úvod

Obiloviny pěstované v klimatických podmínkách mírného pásu jsou často kontaminovány fusariovými mykotoxiny, což jsou sekundární toxické metabolity produkované mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium*. K jejich rozvoji dochází v průběhu pěstování plodin na polích. Kontaminace zrna obilovin je významně ovlivněna počasím – zejména množstvím srážek a průběhem teplot v období, které je rizikové pro vznik a rozvoj infekce. Potenciální infekci mikromycetami a následnou kontaminaci mykotoxiny lze do určité míry omezit vhodnými agrotechnickými zásahy, jako je například dodržování správného střídání plodin v osevním postupu, či volbou odolnějších odrůd (Champeil *et al.*, 2004).

Mykotoxiny v obilovinách jsou díky vysoké teplotní a fyzikální a chemické stabilitě velmi závažným problémem, a ani podmínky při technologickém zpracování potravin nedokáží významně redukovat jejich množství.

Mezi nejfrekventovanější fusariové mykotoxiny patří trichotheceny. V našich klimatických podmínkách jsou produkovány trichotheceny typu A a B. Trichotheceny A (HT-2 toxin a T-2 toxin) jsou toxičtější než typ B. Nejčastěji se vyskytujícím trichothecenem typu B je deoxynivalenol (DON), považovaný za markerový fusariotoxin, indikující úroveň kontaminace *F. culmorum* a *F. graminearum* (Tutelyan, 2004). Maximální limity pro kontaminaci vybranými fusariotoxiny jsou v ČR a EU stanoveny Nařízením komise (ES) č 1126/2007. Pro deoxynivalenol (DON) platí limit  $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  pro zpracované cereální produkty pro kojeneckou výživu, u nezpracované suroviny (pšenice, ječmen) je to  $1250 \mu\text{g.kg}^{-1}$  u nezpracované pšenice tvrdé, ovsa a kukuřice až  $1750 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

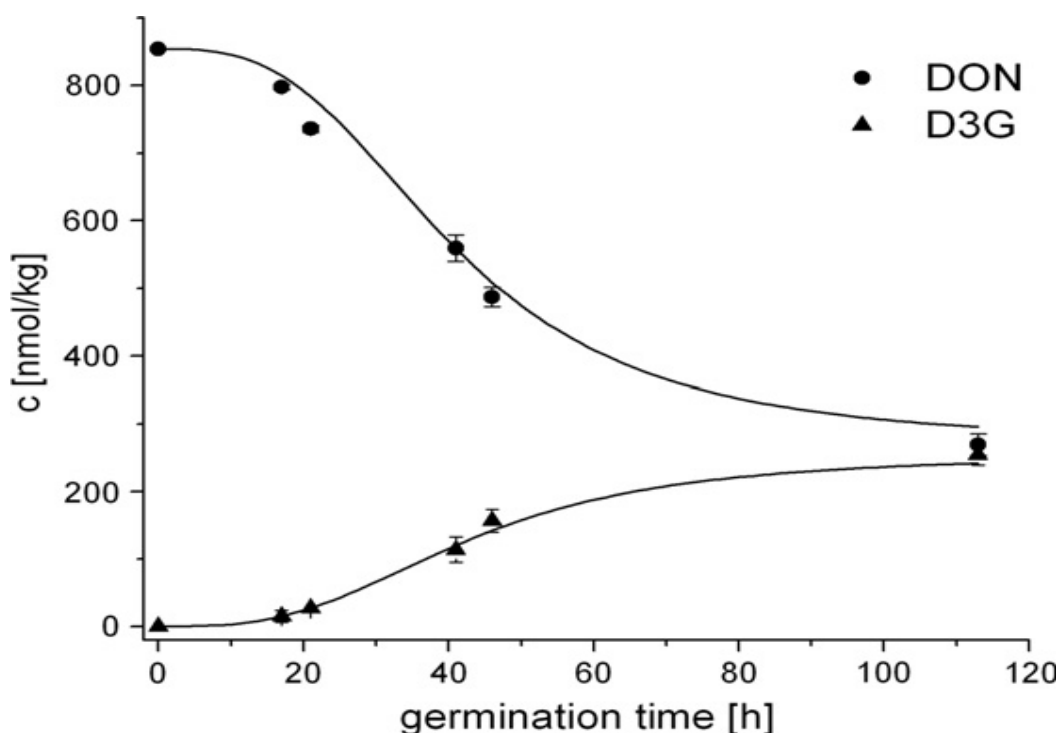
Vedle volného deoxynivalenolu se v cereálních produktech vyskytují také konjugované maskované formy DON, např. deoxynivalenol-3-glukosid (D3G), který byl v cereálních produktech opakovaně prokázán. D3G vzniká přirozenou cestou v rostlinách a semenech napadených fusariem jako dekontaminační produkt metabolismu toxického DON. Naše výsledky naznačují, že tyto konjugované formy se mohou vyskytovat v semenech v množstvích dokonce

převyšujících obsah toxického DON. Navíc, se změnou klimatických podmínek (střídání teplých období a období intenzivních srážek) jsou stále častěji detekovány také další fusariotoxiny, jako jsou např. enniatiny, jejichž hladiny v pšenici, ječmeni a žitu často přesahují i 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  suroviny. Z tohoto pohledu by zavedení kontrolních systémů do laboratoří mlýnů a pekáren bylo významným krokem směřujícím ke zdravotně bezpečnějším potravinám.

Doporučení sledovat všechny tyto „nové“ přírodní toxiny a získat tak data pro odhad dietárního příjmu lidmi i zvířaty deklaruje dokument EFSA (Battilani *et al.*, 2008) a jako prioritu tuto oblast specifikuje i Evropská komise, DG Consumers and Health (Verstraete, 2009).

Jak již bylo uvedeno, vedle volných mykotoxinů, které se běžně analyticky stanovují, se mohou v cereáliích vyskytovat také maskované (konjugované) mykotoxiny. Konjugované formy mykotoxinů vznikají při detoxikačních procesech obilovin (Berthiller *et al.*, 2005). Detoxikační reakce rostlin při napadení fuzárií chrání rostliny před toxickými látkami, které rostliny samy tvoří. Nejfrekventovanějšími změnami jsou tzv. transformační reakce a konjugace (deepoxidace, deacetylace a isomerie), kdy reaktivní funkční skupiny látek jsou redukovány či vázány na jiné látky tak, aby se snížila nebo úplně eliminovala toxicita původního metabolitu (Engelhardt, 1999). Vzniklé produkty jsou následně ukládány do buněčných vakuol (Berthiller *et al.*, 2005). Pokud je místem infekce fusariem klas, jsou detoxikované metabolity ukládány také do zrn, kde je pak následně můžeme detekovat jako maskované mykotoxiny. Nárůst maskované formy D3G byl zjištěn také např. v průběhu technologického procesu sladování, kdy v původním zrně ječmene byl detekován pouze DON. V průběhu sladování (klíčení) byly pozorovány nejen nárůsty D3G, ale také acetylovaných forem DON a HT-2 (Lancová *et al.*, 2008). Maul *et al.* (2012) uvádí transformaci DON na D3G jako přirozenou detoxikační reakci u klíčících (živých) zrn obilnin (graf 1). Je tedy zřejmé, že hodnocení samotného primárně produkovaného DON je nedostačující pro posouzení celkové kontaminace, jak u nezpracovaných surovin, tak u zpracovaných produktů.





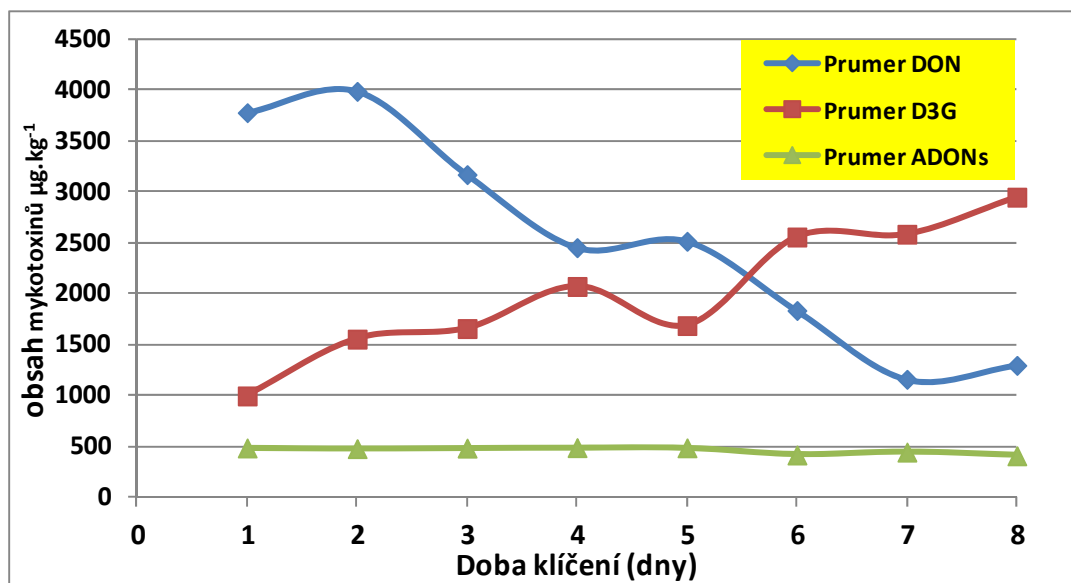
Graf 1. Přeměna DON na D3G u klíčících vzorků pšenice

Stanovení množství DON v rostlinách nebo semenech využívají také šlechtitelé odrůd pro selekci rezistentních genotypů. Jako rezistentní genotypy jsou chápány genotypy akumulující méně DON (Lemmens *et al.*, 2005; Chrpová *et al.*, 2008). Shin *et al.*, 2012 a Gardiner *et al.*, 2010 uvažují jako klíčovou schopnost pro rezistenci genotypů k fusariové infekci právě transformaci DON na D3G.

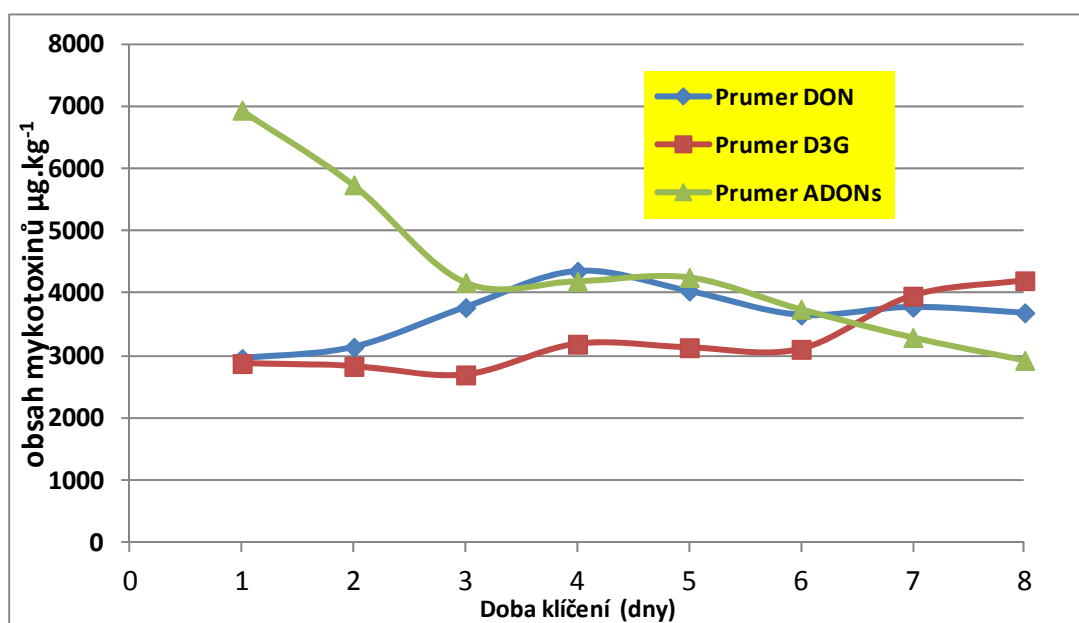
Jak ale uvádějí Bollina *et al.* (2011), problematika akumulace DON v rostlinách (a i v semenech) je složitější. U některých genotypů je tvorba primárního DON redukována díky antioxidačním schopnostem jejich metabolitů (fenolické kyseliny, flavonoidy). U jiných genotypů byla detekována vyšší schopnost glukosyltransferázy transformovat vznikající DON na D3G. Oba mechanismy jsou základem rezistence odrůd vůči infekci k fusariu, bohužel konjugované formy mykotoxinů jsou netoxické pouze pro rostlinu, při hydrolýze v procesu trávení u živočichů se z konjugovaných forem může opět uvolňovat toxický DON (Berthiller *et al.*, 2011).

Také v našich experimentech, předcházejících této metodice, byla zjištěna transformace volného DON na konjugovaný D3G v průběhu naklíčování zrna

pšenice a ječmene. Významný je především fakt, že u klíčení nedochází k výraznému snížení celkové hladiny mykotoxinů, jen se mění jejich forma. Proto je třeba v zrně obilnin sledovat nejen původní, běžnými metodami snadno detekovatelný DON, ale také jeho maskovanou formu D3G a další transformované produkty 3-ADON a 15-ADON. (viz grafy 2 a 3). Kromě D3G byly v cereáliích detekovány i výše glukosilované formy jako deoxynivalenol- di-glukosid a deoxynivalenol-tri-glukosid (Zachariasova, et al., 2012).



Graf 2. Změny obsahu mykotoxinů v klíčících obilkách pšenice



Graf 3. Změny obsahu mykotoxinů v klíčících obilkách ječmene

V případě přirozeně a uměle kontaminovaných vzorků pšenice a ječmene se tedy DON i D3G (a další transformované 3-/15-ADON) mohou vyskytovat v různém množství, v závislosti na odrůdě a její schopnosti transformovat toxický DON v pro rostliny netoxické formy. Celková kontaminace mykotoxiny se ovšem na základě našich výsledků zřejmě výrazně nemění a potenciální toxicita tak zůstává prakticky stejná.

K predikci celkové kontaminace zrna obilovin mykotoxiny (včetně mykotoxinů obsažených v konjugovaných formách) může napomoci jednoduchý diagnostický klíčící test s následnou analýzou přítomných mykotoxinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí (U-HPLC-HRMS).

## 2. Vlastní metodika

### 2.1 Klíčící test

#### Materiálové vybavení pro klíčící test

- Analytické váhy
- Pipety pro dávkování mořidla
- Plastové misky pro ruční moření nebo laboratorní mořička
- Plastové misky pro klíčení semen
- Sušárna pro vysušení naklíčených semen

#### Odběr základního vzorku

Odběr vzorku semen pro klíčící test je shodný s pravidly pro odběr rostlinného materiálu ČSN EN ISO 24333, kdy cílem je zajistit maximální možnou věrohodnost a reprezentativnost vzorku. Počet dílčích vzorků se řídí velikostí zpracovávané partie, způsobem uložení a počtem obalů. Minimální počet odběrů je 5. Zásadou je odebírat vzorky z více míst partie. Ze souhrnného vzorku vzniklého z těchto dílčích vzorků musí být následným dělením (kvartací nebo použitím dělidla) připraven vzorek o velikosti 200 g určený k namoření.

*Tab 1. Počet dílčích vzorků podle velikosti partie*

Hmotnost [t]	Druhá odmocnina	Počet dílčích vzorků
25	5	5
50	7,1	5
100	10	5
500	22,5	12
1000	31,6	16

#### Moření semen

Namoření semen před vlastním naklíčováním slouží k potlačení dalšího rozvoje fuzárií v průběhu klíčení a tím zamezení sekundární tvorby mykotoxinů. Souhrnný vzorek o velikosti 200 g se namoří vhodným přípravkem v dávce 10 x vyšší než je doporučená dávka pro moření osiva obilnin pro výsev. Pro moření je možné použít kterékoliv z mořidel z Katalogu přípravků na ochranu rostlin povolených pro moření pšenice a ječmene proti fuzariózám. Po namoření se

semena nechají zpětně vyschnout na vlhkost 14 %, úroveň obvyklou pro skladování obilnin.

**Při moření a manipulaci s namořenými vzorky je nutno dodržovat pravidla bezpečnosti práce s mořidly.**

### **Klíčící test**

Pro stanovení celkové úrovně kontaminace se semena obilovin nechají vyklíčit.

Test se provádí ve 3 opakováních, po 50 g semen. Jednotlivá opakování jsou odvážena z namořeného 200 g vzorku, vložena do plastových misek pro klíčení a zalita v poměru 1:1 vodou, tak aby začala klíčit. Je možné použít vodu z vodovodního řádu.

Klíčení probíhá po dobu 8 dnů, při teplotě místnosti 20–22 °C.

Vyklíčené vzorky jsou neprodleně vysušeny v sušárně (105°C, 3 hodiny).

## **2.2 Stanovení mykotoxinů**

### **Bezpečnost práce**

S kontaminovanými vzorky a standardy mykotoxinů je třeba pracovat jako s toxickými látkami (tj. látkami, které po vdechnutí, požití nebo proniknutí kůží mohou i v malém množství způsobit akutní nebo chronické poškození zdraví nebo smrt). Od přípravy vzorků až po U-HPLC-HRMS měření je nutno pracovat v gumových rukavicích. Všechny pracovní pomůcky včetně skla, které přišly do styku se standardy nebo roztoky mykotoxinů musí být dekontaminovány v roztoku chlornanu sodného (0,25% NaClO / 0,025 M NaOH). Zbytky standardních roztoků a vzorků po analýze jsou ukládány samostatně a po dekontaminaci roztokem chlornanu sodného likvidovány.

### **Přístroje a zařízení**

- homogenizátor RETSCH GM200, Retsch GmbH (Německo)
- elektronické váhy HF-1200 G, A&D Instruments LTD (Japonsko)
- automatická pipeta 10 ml, Transferpette (Německo)
- centrifuga Eppendorf 5430, Eppendorf (Německo)

- přístroj pro přípravu deionizované vody Milli-Q, Millipore (Francie)
- skleněné mikrostříkačky (25, 100, 250 a 500 µl), Hamilton (USA)

### **Zařízení pro kapalinovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem**

- LC-MS instrumentace

- ultra-účinný kapalinový chromatograf ACQUITY UPLC®, Waters (USA)
- hmotnostní spektrometr s analyzátozem typu Orbitrap, Exactive Orbitrap MS, Thermo Fisher Scientific (USA)
- kolona: Hypersil Gold (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm)

- Sběr a zpracování dat pomocí softwaru Xcalibur®

*Poznámka: přístroje a zařízení uvedených dodavatelů byly použity při vývoji a validaci této metody, lze ale použít položky od alternativních dodavatelů, pokud jsou pro daný účel vhodné. Vhodnost musí být dokumentována při implementaci metody v konkrétních podmínkách.*

### **Chemikálie a pomůcky<sup>1</sup>**

- methanol, HPLC gradient, Merck (Německo)
- mravenčan amonný, p.a., Sigma-Aldrich (USA)
- chlornan sodný, Penta, Chrudim, (ČR)
- automatická mikropipeta, 0,5-5 ml, TreffLab (Švýcarsko)
- automatické mikropipety, 100 – 1000 a 20-200 µl, 10 ml, Biohit (Německo)
- mikrostříkačky o objemu 10, 100, 250 a 500 µl, Hamilton (USA)
- běžné laboratorní sklo a vybavení
- skleněné plastové vialky (PTFE) s konickým dnem, víčka, septa
- plastové (PTFE) kyvety o objemu 50 ml
- technické plyny: dusík, Linde Technoplyn (ČR)
- certifikované standardy jednotlivých mykotoxinů (Tab. II)
- laboratorní sklo, Simax (ČR)
- mikrofiltry (0,2 µm), Alltech (USA)
- inserty, Alltech (USA)

Tab. II: Seznam použitých standardů<sup>1</sup>

Mykotoxin	CAS	Výrobce	Kód produktu	Množství dodaného std.
DON	51481-10-8	Biopure	BRM 001001	1 mg
D3G	131180-21-7	Biopure	BRM S02046	1 ml, MeCN, 100 µg/ml
3-ADON	50722-38-8	Biopure	BRM 001003	5 mg
15-ADON	88337-96-6	Biopure	BRM 001006	5 mg

<sup>1</sup> Validace metody byla provedena s uvedenými chemikáliemi; lze však použít i jiného dodavatele za předpokladu, že kvalita bude odpovídající.

## Pracovní postup

### Příprava zásobních roztoků standardů

Standardy jsou od výrobce dodávány jako pevné látky nebo v roztoku acetonitrilu, viz. Tabulka II. Pevné standardy jsou před použitím rozpuštěny v acetonitrilu a spolu s kapalnými standardy jsou skladovány při teplotě -18 °C. Základní roztoky standardů 3-ADON a 15-ADON mají koncentraci 500 µg/ml (5 mg rozpuštěno v 10 ml MeCN) a základní standard pro DON má koncentraci 100 µg/ml (1 mg rozpuštěno v 10 ml MeCN). Z těchto základních roztoků standardů je připraven pracovní roztok o koncentraci 10 000 ng/ml a následně jeho ředěním pracovní roztok o koncentraci 1000 ng/ml, který je dále použit k přípravě kalibrační řady matričních standardů a pro cílenou kontaminaci vzorků za účelem zjištění validačních charakteristik využití metody.

### Příprava kalibračních roztoků matričních standardů

Matriční směsné standardy sledovaných analytů (body kalibrační křivky) o koncentracích 0 až 1000 ng/ml jsou připraveny odebráním vypočítaných objemů z pracovního standardu o koncentraci 1000 ng/ml obsahujícího všechny mykotoxiny do vialek, odfoukáním acetonitrilu jemným proudem dusíku a rozpuštěním v 1 ml „blankového“ extraktu (tj. extraktu vzorku, který neobsahuje mykotoxiny).

Kalibrační roztoky čistých i matričních standardů byly uchovány v mrazáku při teplotě -18 °C.

### Homogenizace vzorků

Laboratorní vzorek naklíčených cereálií je homogenizován elektrickým mlýnkem a před odběrem navážky důkladně promíchán.

## Extrakce

Postup spočívá v navážení 40 g homogenizovaných naklíčených cereálií do 500 ml Erlenmeyerovy baňky, které jsou extrahovány 200 ml deionizované vody po dobu 60 minut při 240 rpm na třepačce. Následně je část extraktu převedena do centrifugační kyvety a extrakt je centrifugován po dobu 5 min při otáčkách 10000 rpm. Po centrifugaci je z horní vodné vrstvy odebrán vzorek pro přečištění pomocí mikrofiltru (centrifugace 2 min při 5000 rpm).

1 ml vzorku připraveného k LC-MS analýze obsahuje 0,2 g původní matrice. Takto připravený vzorek je převeden do vialky. Vzorky jsou analyzovány vždy ve stejný den, kdy jsou extrahovány.

## Identifikace, kvantifikace a detekce

Pro kvantitativní stanovení sledovaných analytů je použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí (U-HPLC-HRMS) s využitím kapalinového chromatografu Acquity UPLC (Waters) a vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru Exactive Orbitrap MS, Thermo Fisher Scientific (USA).

## Chromatografické podmínky U-HPLC

Separace analytů je prováděna za podmínek dále popsané kapalinové chromatografie na koloně Acquity Hypersil Gold. Pro analyty ionizující v negativním módu elektrospreje (ESI-) je použito složení mobilní fáze a gradient uvedené níže.

### Mobilní fáze

- redestilovaná voda je získána přečištěním z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q
- 5 mM vodný roztok mravenčanu amonného se získá rozpuštěním 0,3125 g mravenčanu amonného v 1 l redestilované vody
- čistý methanol je do systému čerpán přímo z originální láhve od výrobce



#### Stabilizace systému

- promytí kolony po dosažení nastavené teploty startovacím poměrem mobilní fáze alespoň 15 minut

*Pozn.: První dva až tři nástříky standardu v sekvenci jsou pouze orientační a používají se k verifikaci systému, zejména k ověření stability retenčních časů.*

#### Kapalinová chromatografie

Přístroj	Acquity UPLC
Kolona	Hypersil GOLD (100mm x 2,1 mm, 1,9 µm)
Teplota kolony	40 °C
Objem nástříku	10 µl
Průtok	0,3 ml/min
Složení mobilní fáze	A: 5 mM mravenčan amonný ve vodě B: 100 % methanol
Teplota autosampleru	10 °C
Doba analýzy	18 min
Gradient mobilní fáze	Tabulka III

*Tab. III: Gradient mobilní fáze*

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Složení mobilní fáze	
		A (%)	B (%)
0	0,300	95	5
6	0,300	50	50
12	0,300	0	100
15	0,300	0	100
15,1	0,300	95	5
18	0,300	95	5

## Hmotnostní spektroskopie

Identifikace analytů je prováděna na základě měření přesné hmoty mykotoxinů  $m/z$  (viz. Tab IV) a také sledováním retenčních časů analytů ve vzorcích a kalibračních standardech. Ke zpracování naměřených dat se používá program Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, USA).

## Parametry U-HPLC-HRMS

### Hmotnostní analyzátor

Přístroj                      Exactive Orbitrap MS, Thermo Fisher Scientific (USA)

### Iontový zdroj

Ionizace	ESI-
Zmlžovací plyn	N <sub>2</sub> , 35 (arb. jednotky)
Pomocný plyn	N <sub>2</sub> , 10 arb. jednotky)
Teplota kapiláry	250 °C
Teplota zahřívače	250 °C
Napětí na kapiláře	-50 V
Napětí na elektrospreji	-3,3 kV
Rozlišení	50 000 FWHM
Akviziční rychlost	2 spektra/s

Sledované analyty byly kvantifikovány metodou vnější kalibrace. Byla připravena matriční pšeničná kalibrační řada na hladinách 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml. Sledované mateřské ionty a jejich výtěžnosti jsou uvedeny v Tabulce IV. Ke zjištění výtěžnosti byly použity vzorky blankové pšenice (pšenice s velmi nízkým nebo žádným přirozeným obsahem mykotoxinů) s přidavkem standardu na hladině 100 ng/g matrice (pro  $n=6$ ). Nejnižším bodem v kalibrační křivce (LOQ – the limit of quantification) byl pro DON, DON3G a ADONs 1 ng/ml (5 ng/g).

Tab. IV: Sledované mateřské ionty a pracovní charakteristiky metody

Analyt	Sumární vzorec	[M]	[M-H] <sup>-</sup>	[M+HCOO] <sup>-</sup>
D3G	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	458,1788	457,1704	<b>503,1770</b>
DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296,126	295,1176	<b>341,1242</b>
ADONs	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338,1366	337,1282	<b>383,1348</b>
DON-diglukosid	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>16</sub>	620,2316	619,2234	<b>665,2298</b>
DON-triglukosid	C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>21</sub>	782,2845	781,2761	<b>827,2827</b>

### Identifikace a kvantitativní vyhodnocení analytů

Identifikace analytů je prováděna na základě měření přesné hmoty mykotoxinů (viz. Tab IV) a také sledováním retenčních časů analytů ve vzorcích a jejich porovnáním s analyty v kalibračních standardech.

### Kvantifikační postup pro LC-HRMS data

Kvantifikace je prováděna metodou vnější kalibrace pomocí matričních kalibračních standardů v koncentračním rozsahu 0 až 1000 ng/ml. V případě velkých sérií vzorků je řada kalibračních standardů analyzována opakovaně vždy po nástřiku 15-20 reálných vzorků. Kalibrace je zpracovávána v programu Microsoft Excel; linearity kalibračních závislostí jsou kontrolovány pomocí regresního koeficientu ( $R^2$ ). Při sestavování kalibračních závislostí pro jednotlivé analyty je nutno používat takové koncentrace standardů, aby odezvy analytů ve vzorcích ležely v rozsahu kalibrace (mezi odezvou nejnižšího a nejvyššího bodu kalibrační závislosti). V případě, že odezva analytů je vyšší a není v rozsahu kalibrace, je nutné vzorek naředit.

Kromě DON, D3G a ADONs lze detekovat i další maskované formy DON-diglukosid a DON-triglukosid. Pro tyto mykotoxiny však nejsou komerčně dostupné standardy a není je proto možné kvantifikovat. Lze pouze vyjádřit jejich procentuální poměr plochy oproti DONu.

## Výpočet koncentrace analytů ve vzorku

$$C_{vz} = \frac{(C_{vz1} - C_{sl}) \times k}{m \times r \times (V_{ext})}$$

$C_{vz}$ .....	koncentrace analytu ve vzorku ( $\mu\text{g/kg}$ )
$C_{vz1}$ .....	koncentrace analytu vypočítaná z kalibrační závislosti (ng)
$C_{sl}$ .....	koncentrace slepého pokusu vypočítaná z kalibrační závislosti (ng)
$m$ .....	navážka vzorku (g)
$V_{ext}$ .....	objem extraktu (ml)
$k$ .....	korekce na skutečný obsah analytu ve standardu (deklarovaná čistota (%/100))
$r$ .....	zpětná výtěžnost postupu (%/100)

## Pracovní charakteristiky metody

### Správnost metody

V současné době není komerčně dostupný certifikovaný referenční materiál obsahující celé spektrum sledovaných analytů. Správnost metody je pravidelně ověřována opakovanou analýzou uměle kontaminovaného materiálu (směsný standard přidáný ke vzorkům cereálií bez přítomnosti nebo s minimální přítomností analyzovaných mykotoxinů). Po přidavku roztoku se vzorek promíchá a nechá minimálně 60 min stát při laboratorní teplotě. Následně se extrahuje příslušným extrakčním postupem. Výtěžnosti jednotlivých analytů v pšenici jsou uvedeny v Tabulce V.

### Rozsah metody a linearita

Vzhledem k tomu, že se analyzované kontaminanty mohou vyskytovat ve vzorcích v širokém rozsahu koncentrací, je nutné volit kalibrační rozsah koncentrací standardů v dostatečně širokém rozmezí.

V používaném kalibračním rozsahu 1 – 1000 ng/ml pro jednotlivé analyty je odezva detektoru za podmínek metody lineární. Linearita kalibrace se kontroluje vynesáním odezev jednotlivých analytů vůči koncentraci do grafu a pomocí

regresního koeficientu ( $R^2$ ). Pokud je odezva některého analytu v neznámém vzorku nad nejvyšším kalibračním bodem, je nezbytné vzorek naředit tak, aby se výsledná koncentrace dostala do kalibračního rozsahu. Ve stejném poměru je nezbytné naředit rovněž „blankový“ extrakt použitý pro matriční standardy.

#### Mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez stanovitelnosti metody (LOQ) pro daný analyt je dána jako nejnížší kalibrační bod, ve kterém je možné analyt stanovit s přijatelnou přesností. Je třeba zdůraznit, že aktuální hodnoty LOQ jsou závislé na konkrétním stavu LC-MS systému (např. stav chromatografické kolony, čistota iontového zdroje) a hodnoty LOQ uvedené v tabulce V jsou tedy pouze orientační.

*Tab. V: Pracovní charakteristiky metody U-HPLC-HRMS pro stanovení DON a jeho konjugovaných forem v naklíčených cereáliích (spiky na hladině 100 µg/kg, n=6)*

Analyt	Sumární vzorec	$t_R^a$	LOQ [µg/kg]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
D3G	$C_{21}H_{30}O_{11}$	4,50	5	93	1,3
DON	$C_{15}H_{20}O_6$	4,39	10	121	6,6
ADONs	$C_{17}H_{22}O_7$	6,67	25	64	13,1
DON-diglukosid	$C_{27}H_{40}O_{16}$	-	-	-	-
DON-triglukosid	$C_{33}H_{50}O_{21}$	-	-	-	-

#### Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody lze charakterizovat relativní směrodatnou odchylkou (RSDr, CVr), která se získá z opakovaných analýz vzorku. Výkonnostní kritéria metod jsou uvedeny v Nařízení komise (ES) č. 401/2006. Hodnoty RSDr (%), které byly získány pro validované matrice, jsou uvedeny v Tabulce V.

## 2.3 Seznam použitých zkratk a symbolů

ESI	ionizace elektrosprejem
3-ADON	3-acetyl-4-deoxynivalenol
15-ADON	15-acetyl-4deoxynivalenol
DON	deoxynivalenol
D3G	deoxynivalenyl-3-glukosid
FHB	Fusarium Head Blight
MS	hmotnostní spektrometrie
LOQ	mez kvantifikace
U-HPLC	extrémně vysokotlaká kapalinová chromatografie

## 2.4 Základní informace o projektu

Základní informace o projektu:

Cílem projektu NAZV QI111B154 "Bezpečnost cereálních bioproduktů z pohledu výskytu alternáriových a fusariových mykotoxinů" je zvýšení bezpečnosti cereálních bioproduktů z pohledu výskytu alternáriových a fusariových mykotoxinů, diagnostika a možnosti minimalizace rizik v rámci celé produkční spirály (farmář - zpracovatel - výrobce).

Doba řešení projektu: 1.1. 2011 - 31.12. 2014

Projektový tým:

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Česká zemědělská univerzita v Praze

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

PRO-BIO, obchodní společnost, s.r.o.

GOODMILLS a.s.

### **III. Srovnání novosti postupů**

Předkládaná metodika nabízí dosud nepoužívaný přístup k hodnocení celkového obsahu mykotoxinů v zrna obilovin. Ukazuje se, že kromě deoxynivalenolu (DON) mohou obilky v různém stavu naklíčení obsahovat také velké množství maskovaných mykotoxinů jako je DON-3- glukosid (D3G), které po naštěpení uvolňují volný, pro organismus toxický DON.

Navrhovaná metodika umožňuje stanovení nejen DON, ale i D3G a 3-/15-ADON. Stanovení obsahu transformovaných mykotoxinů společně s DON tak pomůže nákupním a zpracovatelským organizacím zpřesnit množství potenciálně nebezpečných mykotoxinů v použité obilní surovině nebo meziproduktech a snížit tak riziko pro spotřebitele. Test je použitelný také při šlechtění nových odrůd pro hodnocení genotypů na rezistenci k fuzáriové infekci, resp. bude možné přesněji specifikovat, zda je rezistence dána více nižší primární produkcí DON nebo pouze vysokou schopností genotypu transformovat přítomný DON na pro rostliny netoxickou formu D3G.



## IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QI111B154 **Bezpečnost cereálních bioproduktů z pohledu výskytu alternáriových a fusariových mykotoxinů**. Vzhledem k tomu, že obsah maskovaných mykotoxinů v cereáliích není dosud legislativně regulován, popisovaná metoda a její uplatnění v praxi by významně přispělo k získání dostatečného množství relevantních dat. Na základě výsledků by mohlo být posouzeno potenciální zdravotní riziko pro populaci a zavedena příslušná legislativní opatření.

Smluvním uživatelem certifikované metodiky je společnost PRO-BIO obch. spol. s.r.o., která se dlouhodobě zabývá zpracováním a obchodem s obilninami (a výrobky) v bio kvalitě. Certifikovanou metodiku bude využívat při hodnocení cereálních potravinářských surovin, které nakupuje a zpracovává. Využití metodiky bude opodstatněné zejména při hodnocení cereální bioprodukce z ročníků, resp. regionů s vyšším výskytem mykotoxinů. S ohledem na to, že provozní laboratoře většinou nedisponují potřebným analytickým vybavením, předpokládá se pro analytickou část metodiky spolupráce s VŠCHT či instrumentálně odpovídajícím způsobem vybavenými komerčními laboratořemi (formou služby) - tím by současně byla zajišťována i distribuce metodiky a informovanost komerčních laboratoří o dané problematice (metodika je samozřejmě využitelná nejen pro hodnocení cereálních bioproduktů, ale i produktů běžného konvenčního zemědělství).

## V. Ekonomické aspekty

Přesné vyčíslení ekonomického přínosu certifikované metodiky je velmi obtížné. Její využití v praxi zatím nevychází z žádné legislativní opory, lze ale očekávat, že perspektivně budou legislativně upraveny limity i pro konjugované formy mykotoxinů. Prvořadým úkolem je tedy zajistit šíření metodiky v praxi - zejména do sféry instrumentálně kvalitně vybavených komerčních laboratoří, případně i do laboratoří šlechtitelských firem. Smluvnímu uživateli - společnosti PRO-BIO, s.r.o., současně využití metody (zejména v případě potravinářských surovin cereálního původu, které by se obsahem mykotoxinů blížily stávajícím limitům) napomůže lépe posoudit potenciální zdravotní riziko pro konzumenty.

Náklady na potřebné vybavení pro zajištění klíčícího testu jsou zanedbatelné. Implementace analytické části metodiky zahrnuje zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména zjištění limitů kvantifikace, linearity, ale také verifikaci metody pomocí přidavku mykotoxinů na předem známou hladinu (např. 100 µg/kg) a zjištění výtěžnosti, případně i opakovatelnosti metody (např. n=6). Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly 2105 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 42,1 tis. Kč. Pokud laboratoř U-HPLC-MS/MS zařízení nevlastní, pohybují se celkové náklady na zavedení výše uvedené metody ve výši cca 8.000 tis. Kč.

## VI. Seznam použité související literatury

1. Battilani, P., Costa, L.G., Dossena, A., Gullino, M.L., Marchelli, R., Galaverna, G. Pietri, A., Dall'Asta, C., Giomi, P., Spadaro, D., Gualla, A. Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants CFP/EFSA/CONTAM/2008/01 <http://www.efsa.europa.eu/de/sdocs/doc/24e.pdf>
2. Berthiller a kol. (2005) Masked Mykotoxins: Determination of Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3421-3425.
3. Berthiller F., a kol. (2008) Occurrence of deoxynivalenol and its 3- $\beta$ -D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants*. **56**, 3422-3426.
4. Berthiller, F., Krska, R., Domig, K.J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R., Adam, G. (2011). Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Tox. Lett.*, **206**:264-267.
5. Boutigny A., Richard-Forget F., Barreau Ch. (2007) Natural mechanism for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 411-423.
6. Engelhardt, G., Ruhland, M., Wallnofer, P.R. (1999). Metabolism of mycotoxins in plants. *Advances in Food Science*, **21**, 71-78.
7. He J., a kol. (2010) Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science and Technology* **21**, 67-76
8. Champoeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F. (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grain, *Plant Sci.* **166**, 1389.
9. Chrpová, J., Štočková, L., Sedláček, T., Veškrna, O., Řehořová, K., Horčíčka, P. (2008). Verification of newly developed method of DON content determination, *Cereal Research Communications* **36**, suppl. B: 349-352.
10. Kostelanska M., a kol. (2009) Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 3187-3194

11. Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostalek, P., Sachambula L. (2008). Transfer of *Fusarium* mycotoxins and masked deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Add. Cont.*, **25**(6), 732-744.
12. Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F. (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1318-1324.
13. Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F.-J., Nehls I. (2012). Germination induces the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chem.* **131**:274-279.
14. Poppenberger B., et al. (2003) Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 47905-47914.
15. Shin, S., Torres-Acosta, J.A., Heinen, S.J. et al. (2012). Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing in barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. *J. Exp. Bot.* **63**, 4731-4740.
16. Tutelyan, V.A. (2004). Deoxynivalenol in cereals in Russia. *Tox. Lett.* **153**, 173.
17. Verstraete, F. (2009). Recent and Future Food Safety Legislation with Focus on Contaminants. On-line: <http://www.rafa2009.eu/speakers/Frans%20VERSTRAETE.pdf>
18. Zachariasova M., et al. (2012) Deoxynivalenol Oligoglycosides: New „Masked“ *Fusarium* Toxins Occurring in Malt, Beer, and breadstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60**, 9280-9291

## VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Zachariasova M., a kol. (2010) Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry* 24: 3357-3367

Kostelanska M., a kol. (2011) Effects of milling and baking technologies on levels of deoxynivalenol and its masked form deoxynivalenol-3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.59: 9303-9312

Malachova A., a kol. (2011) Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The Major Mycotoxins Found in Cereal-Based Products on the Czech Market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.59: 12990-12997

Zachariasova M., a kol. (2012) Deoxynivalenol Oligoglycosides: New „Masked“ fusarium Toxins Occurring in Malt, Beer, and breadstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.60, 9280-9291

Název: Diagnostický klíčící test pro stanovení celkové kontaminace zrna obilovin fusariovými mykotoxiny (metodika pro praxi)

Autoři: K. Pazderů, Z. Vepříková a kol.

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Vydání: 1. vydání, 2013

Počet stran: 28

Náklad: 200

Tisk: tiskárna Power Print

ISBN: 978-80-213-2427-5